

12.05.99

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 02 JUL 1999
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年12月24日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第366819号

出 願 人
Applicant(s):

積水化学工業株式会社

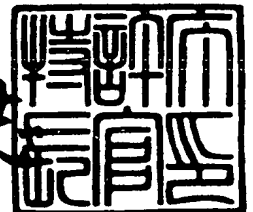
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月17日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山 建 志



出証番号 出証特平11-3039393

【書類名】 特許願

【整理番号】 98P03641

【提出日】 平成10年12月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/53

【発明の名称】 免疫測定法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社
内

【氏名】 吉川 勝己

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社
内

【氏名】 横井 正之

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社
内

【氏名】 赤峰 隆之

【特許出願人】

【識別番号】 000002174

【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社

【代表者】 西澤 進

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第133995号

【出願日】 平成10年 5月15日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005083

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫測定法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定法であって、

（a）上記抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素とを担持させた不溶性担体、

（b）上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤、および

（c）上記酵素の基質

と上記試料とを混合し、抗原抗体反応による不溶性担体の凝集反応と酵素反応を生じせしめ、生じた反応の度合いを測定することを特徴とする免疫測定法。

【請求項 2】 酵素阻害剤が、該酵素に対する抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の免疫測定法。

【請求項 3】 酵素に対する抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 2 記載の免疫測定法。

【請求項 4】 不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有されており、上記抗体（または抗原）、酵素および酵素阻害剤としてそれぞれ少なくとも 2 種類以上が組み合わせて用いられることを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、不溶性担体を利用する免疫測定法、特に、測定対象物質を高感度で測定可能な免疫測定法に関する。

【0002】

【従来技術】

臨床検査の分野では、生体試料（血液、尿など）を用いて種々の疾患の診断を行っているが、これらを診断する方法として、種々の測定法が開発され利用されている。これらの測定法の代表的方法として、酵素反応を利用する生化学測定法

や抗原抗体反応を利用する免疫測定法が挙げられる。近年においては、生体試料中の成分を精度よく測定することが望まれ、特異性の高い抗原抗体反応を利用した免疫測定法が盛んに用いられている。

【0003】

免疫測定法としては、免疫比濁法（T I A法）、ラテックス比濁法（L I A法）、酵素免疫測定法（E I A法）、放射免疫測定法（R I A法）などが挙げられ、目的に応じて使い分けされている。すなわち、生体試料中に含まれている成分の量が比較的多い場合は、T I A法やL I A法が使用されている。T I A法やL I A法では、測定する生体試料中の成分としては、例えば、C反応性タンパク質（C R P）、抗ストレプトリジン-O抗体（A S O）、フィブリン分解産物（F D P）などが挙げられ、生体試料中の濃度として、数 n g / m L 以上の場合に用いられる。これに対して、生体試料中に含まれる成分の量が微量の場合は、E I A法やR I A法が使用され、測定する生体試料中の成分としては、例えば、 α フェトプロテイン（A F P）に代表される癌マーカーやインシュリンに代表されるホルモンなどが挙げられ、生体試料中の濃度として、数 n g / m L 以下の場合に用いられる。

【0004】

更に、近年、生体試料中の微量成分の測定が重要視され、E I A法やR I A法などが益々利用されてきている。しかしながら、E I A法やR I A法は、T I A法やL I A法が測定に要する時間が短く、操作が簡便で種々の自動分析装置（以下、汎用自動分析装置）へ適用可能であるのに比べて、反応時間が長く、操作法が煩雑で、かつ、使用する酵素や放射性同位元素の種類が種々あるため、特定の自動分析装置（以下、専用自動分析装置）へのみ適用される場合が多く、R I A法に至っては放射性同位元素を利用するため特定の施設が必要というような種々の問題がある。

【0005】

近年、生体試料中の微量成分の測定においては、癌などの早期発見やエイズウイルスなどの感染初期を診断するため、超微量でも測定できるような方法が要望されている。超微量測定が可能な手法としては、L I A法やE I A法の変法また

は改良法など測定法自体の精度を上げる手法と、L I A法やE I A法などでは従来からの方法で測定に使用する装置の性能を上げる手法に大別され、一部実用化されている。

【0006】

測定法自体の精度を上げる手法としては、L I A法の不溶性担体を着色する方法（特開平1-214760号公報）、E I A法の抗原または抗体を標識する物質として酵素の代わりに、発光物質を利用する方法（特開平5-34346号公報）などが挙げられる。また、装置の性能を上げる手法として、特開平3-167475号公報に提案される方法がある。

【0007】

しかしながら、これらのいずれの手法においても、汎用自動分析装置への適用は不可能であり、専用自動分析装置が必要という問題は解決されていない。専用自動分析装置が必要な理由は、上述のように、E I A法やR I A法に代表される微量成分の測定法は、反応時間、操作法、使用する酵素や放射性同位元素の種類などが測定法により種々異なるためであるが、これら以外の大きな理由として、現在、開発または上市されている微量成分の測定法は、B/F分離と呼ばれる操作（Bは反応により結合したもの、Fは未反応のもの）が必ず必要であるため、B/F分離操作のできない汎用自動分析装置へは適用できず、B/F分離操作のできる専用自動分析装置が必要となってくる。

【0008】

最近、特開平5-249112号公報、特開平7-179495号公報などにみられるように、B/F分離の不必要な測定法も提案、開発されつつあるが、感度不足、測定時間が長いなどの問題により、専用自動分析装置が必要となったり、一部の汎用自動分析装置しか適用できないなどの問題がある。

【0009】

一方、臨床検査の現場においては、超微量分析を行うには高価な専用自動分析装置が必要で、かつ、設置場所を確保しなければならないため、汎用自動分析装置による超微量成分の測定を望む声大きい。

【0010】

また、臨床現場では一つの生体試料より複数の項目を測定することが多く、そのため一つの生体試料を繰り返し違う方法で測定することが多々あり、測定時間がその分長くかかったり、測定者が生体試料に触れる機会が多くなり感染の危険があるという問題があった。

【0011】

以上の記述を要約すると、現在、開発または上市されている超微量成分の測定は、ユーザーの強い要望があるにもかかわらず、B/F分離操作が必要なため、専用自動分析装置での測定に限られているという大きな問題点がある。

また、上記のように、一つの生体試料より複数の項目を測定する場合には、測定時間が長くなる問題、測定者の感染の危険性の問題などがある。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記問題点を解決するものであり、その目的は、①試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、B/F分離を必要としないか、またはB/F分離を簡便化して、簡便に分析測定できる免疫測定法、②B/F分離を簡便化することにより、測定を簡便化し、一度に多項目測定可能な免疫測定法、のうちの少なくとも一つを提供することである。

【0013】

【課題を解決するための手段】

以下、本明細書において、一文章中に、抗原（または抗体）という表現と、抗体（または抗原）という表現がある場合、括弧内は括弧内同士が対応し、括弧外は括弧外同士が対応しているものとする。

【0014】

本発明者らは、上記のような課題に鑑み、新規でかつ従来と同等もしくはそれ以上に感度が高く、かつ、汎用自動分析装置へ適用可能な免疫測定法の開発のため、鋭意研究を重ねた結果、B/F分離の必要がないか、またはB/F分離を簡便化できる微量成分の新規分析法を完成するに至った。

【0015】

すなわち、請求項1記載の発明は、試料中の測定対象物質である抗原（または

抗体)の量を測定するための免疫測定法であって、

(a) 上記抗原(または抗体)に対する抗体(または抗原)と酵素とを担持させた不溶性担体、

(b) 上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤、および

(c) 上記酵素の基質

と上記試料とを混合し、抗原抗体反応による不溶性担体の凝集反応と酵素反応を生じせしめ、生じた反応の度合いを測定することを特徴とする免疫測定法である。

【0016】

請求項2記載の発明は、酵素阻害剤が、該酵素に対する抗体であることを特徴とする請求項1記載の免疫測定法である。

請求項3記載の発明は、酵素に対する抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項2記載の免疫測定法である。

請求項4記載の発明は、不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有されており、上記抗体(または抗原)、酵素および酵素阻害剤としてそれぞれ少なくとも2種類以上が組み合わせて用いられることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の免疫測定法である。

【0017】

【作用】

以下、本発明の作用について詳細に述べる。

同一の不溶性担体上に、生体試料中の測定対象物質である抗原(または抗体)に対する抗体(または抗原)と酵素とを担持させた不溶性担体を含む第1試薬と、上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤(以下、酵素阻害剤という)と上記酵素の基質を含む第2試薬とを、上記測定対象物質が含まれている生体試料と混合すると、2種類の反応が進行する。第1の反応は、生体試料中の抗原(または抗体)と不溶性担体に担持された抗体(または抗原)との抗原抗体反応である。この第1の反応はLIA法と同原理であり、第1の反応により、不溶性担体の凝集が起こり、濁りが上昇し吸光度変化が生じる。一方、第2の反応は酵素と基質による反応であり、EIA法の検出と同原理であり、基質が変化することにより、吸

光度変化が生じる。

【0018】

第1の反応と第2の反応は互いに独立してかつ同時に起きるため、吸光度変化量はLIA法より大きくなり生体試料中の微量成分の測定が可能となる。しかしながら、第1の反応は、生体試料中に含まれる抗原（または抗体）の量に依存して吸光度が変化するが、第2の反応は、酵素と基質の反応であるため、生体試料中に含まれる抗原（または抗体）の量に依存した反応ではない。

【0019】

そこで、本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、酵素阻害剤を該反応系に添加することにより、第2の反応が生体試料中の抗原（または抗体）の量に依存するようになることを見出した。酵素阻害剤は酵素に結合すると酵素活性を失活または減少させるものであるが、生体試料中に抗原（または抗体）が含まれていない時は、第1の反応による不溶性担体の凝集が生じていないため、酵素阻害剤が不溶性担体上の酵素に結合して酵素を失活させ、酵素による吸光度変化を生じさせない。これに対して、生体試料中に抗原（または抗体）が含まれると、第1の反応による不溶性担体の凝集が生じる。この時、凝集に関与している不溶性担体上の酵素と酵素阻害剤との結合は、凝集塊の立体障害のため起こりにくくなり、酵素が失活せず基質と反応し吸光度変化が生じる。

【0020】

このようにして、酵素阻害剤を該反応系に添加することにより、第2の反応も生体試料中の抗原（または抗体）の量に依存させることができるようになる。このように、本発明の免疫測定法は、第1の反応と第2の反応が共に、生体試料中の抗原（または抗体）の量に依存した反応となるため、LIA法より高感度であり、かつ、EIA法などと違って、B/F分離の必要がない新規な免疫測定法となる。

【0021】

さらに、請求項4記載の発明においては、不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有されており、上記抗体（または抗原）、酵素および酵素阻害剤としてそれぞれ少なくとも2種類以上が組み合わせて用いられているので、一度に

多項目測定が可能である。

【0022】

すなわち、この方法は、上記第1試薬の不溶性担体として、その中に、磁性物質または可磁化物質が含有された担体を用い、該担体に生体試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素とを担持させた試薬を作製する。さらに、上記と同一生体試料中の上記とは異なる測定対象物質である抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と上記とは異なる酵素とを担持させた試薬を、少なくとも1種類以上製造する。これらの試薬をそれぞれ混合して、第1試薬とする。

【0023】

また、第1試薬中のそれぞれの酵素に対応する、基質および酵素阻害剤を混合して第2試薬とする。

上記第1試薬と第2試薬とを、上記測定対象物質が含まれている生体試料と混合して反応させる。反応後、反応に用いた容器の下から磁石で不溶性担体を引きつけ、容器の底部に沈殿させる。すると、溶液中には酵素によって反応した基質のみが残り、生体試料中の成分濃度に合わせて発色している。この場合、それぞれの酵素に対応する基質が反応し発色しているので、それぞれの基質反応物の吸光度をそれぞれ測定することにより、それぞれの濃度を独立に、また、同時に測定できる。

【0024】

【発明の実施の形態】

本発明により測定される測定対象物質としては、生体試料中の抗原または抗体が挙げられ、例えば、肝炎（B型、C型）由来抗原または抗体；HIV抗原または抗体；梅毒由来抗原または抗体； α -フェトプロテインに代表される癌マーカー；インシュリンに代表されるホルモン；オータコイドなどが挙げられるが、特にこれらに限定されない。

【0025】

本発明に使用される不溶性担体としては、例えば、有機高分子粉末、微生物、血球および細胞膜片等が挙げられる。有機高分子粉末としては、例えば、不溶性

アガロース、セルロース、不溶性デキストランなどの天然高分子粉末；ポリスチレン、スチレン-スチレンスルホン酸（塩）共重合体、スチレン-メタクリル酸共重合体、アクリロニトリル-ブタジエーン-スチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル-アクリル酸エステル共重合体などの合成高分子粉末などが挙げられる。特に、合成高分子粉末を均一に懸濁させたラテックスが好ましい。上記不溶性担体は、その使用目的・用途などにより異なるが、通常、化学合成により製造するか、または、市販されているものを使用する。また、表面にスルホン酸基やカルボキシル基などを導入した不溶性担体も適宜使用可能である。上記ラテックスを用いる場合、そのラテックス粒子の粒径は、 $0.05 \sim 1.5 \mu\text{m}$ が好ましく、 $0.1 \sim 0.6 \mu\text{m}$ がより好ましい。

【0026】

請求項4記載の発明に使用される不溶性担体は、上記担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有されているものであり、可磁化物質としては、例えば、酸化鉄が挙げられる。請求項4記載の発明に使用される不溶性担体の具体的な例としては、ベリタス社製、ダイナビーズが挙げられる。

【0027】

本発明に使用される酵素としては、基質と反応して吸光度変化を生じるものであれば特に限定されない。例えば、パーオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼなどが挙げられるが、特にこれらに限定されない。酵素には、天然物から得られたもの、遺伝子工学的手法により得られたものなどがあるが、いずれも使用可能である。通常は、天然物から得られたものを使用すればよい。

【0028】

また、上記酵素を測定に使用する際は、適当な緩衝液などで希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、Good緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。酵素の使用時の濃度としては、 $0.001 \sim 10 \text{ IU/mL}$ が好ましいが、使用する酵素の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

【0029】

次に、本発明に使用される基質は、使用する酵素と反応して吸光度変化を生じるものが用いられる。例えば、酵素としてパーオキシダーゼを使用する場合は基質として過酸化水素水にN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンを加えたもの、または、過酸化水素水にo-フェニレンジアミンやピロガロールを加えたもの、酵素としてアルカリフォスファターゼを使用する場合は基質としてp-ニトロフェニルリン酸、酵素としてβ-ガラクトシダーゼを使用する場合は基質としてo-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドなどが挙げられるが、特に限定されず、目的・用途に応じて適宜選択される。

【0030】

上記の基質は、通常、化学合成により製造するか、または、市販されているものを使用する。測定に使用する際は適当な緩衝液などに溶解・希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、Good緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。基質の使用時の濃度としては、0.1~1000mMが好ましいが、使用する基質の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

【0031】

次に、本発明に使用される酵素阻害剤としては、使用する酵素と結合して酵素活性を失活させるものであれば、特に、限定されず、例えば、ペプチド、抗体、フッ素化合物、イオウ化合物など、使用する酵素によりそれに対応した酵素阻害剤を用いる。

酵素阻害剤として、酵素に対する抗体（以下、抗酵素抗体という）を用いる場合は、抗体種としてはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよく、また、製造方法についても、公知の方法のいずれでもよい。ポリクローナル抗体であれば、ウサギ、山羊、めん羊などの動物に、使用する酵素を免疫して産生させればよい。モノクローナル抗体についても公知の方法を用いて得ることができる。

【0032】

このようにして得られた抗体については公知のクロマトグラフィーなどによって適宜精製してもよいし、場合によっては特別の精製をせずに用いてもよい。また、測定に使用する際は適当な緩衝液などで希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、Good緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。

【0033】

酵素阻害剤の使用時の濃度としては、0.01~10mg/mLが好ましいが、使用する酵素阻害剤の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

【0034】

本発明で用いる、抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素とを担持させた不溶性担体（a）を製造する方法について説明する。

不溶性担体への抗体（または抗原）と酵素の結合方法は、使用する抗体（または抗原）及び酵素の種類により異なるが、通常、以下に示す方法で行う。抗体（または抗原）を含む溶液と酵素を含む溶液を同時に、または、順次、不溶性担体の懸濁液に添加し攪拌すると、物理的吸着により抗体（または抗原）と酵素が不溶性担体に結合する。

【0035】

また、表面にスルホン酸基やカルボキシル基が導入されている不溶性担体については、適当な架橋剤を添加することにより、抗体（または抗原）と酵素を不溶性担体に結合させることができる。この場合、架橋剤で架橋できるように、抗体（または抗原）と酵素を修飾する必要がある。物理的に吸着させるか、架橋剤により結合させるかは、使用する抗体（または抗原）と酵素の物性や構造を考慮に入れ、適宜選択すればよい。

【0036】

上記結合反応時のpHは3~10、温度は2~50℃が好ましい。pHがこの範囲をはずれると、抗体（または抗原）がタンパク質であるため変性してしまう

などの問題がある。また、温度については、2℃未満であれば反応速度が遅く、所望の感度を有するものが得にくくなり、50℃を超えると、抗体（または抗原）が変性してしまうなどの問題がある。

【0037】

次に、本発明の免疫測定法の実施の一例について具体的に述べる。

測定対象物質である抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素とを担持させた不溶性担体（a）を第1試薬とし、上記酵素に対する抗体（b）および上記酵素の基質（c）を含む溶液を第2試薬とする。

測定対象物質である抗原（または抗体）を含む試料と第1試薬および第2試薬を混合すると、試料中の抗原（または抗体）と不溶性担体に結合した抗体（または抗原）との抗原抗体反応による不溶性担体（a）の凝集が生じる。一方、酵素と基質（c）の反応による吸光度変化も生じる。凝集による吸光度変化と酵素反応による吸光度変化を光学的に測定することにより、試料中の抗原（または抗体）の量を測定する。測定波長は、使用する不溶性担体の種類、酵素と基質の種類により異なるが、250～1000nmが使用できる。この測定法において、抗原抗体反応および酵素反応の条件は通常の場合と同様であり、反応媒体としては、各種緩衝液が用いられる。この緩衝液は、生体試料中の抗原（または抗体）を失活させることなく、かつ、抗原抗体反応および酵素反応を阻害しないようなイオン強度及びpHを有するものであればよい。例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液などが使用される。反応温度は、10～50℃、特に20～40℃が好ましい。

【0038】

【実施例】

実施例 1

（1）免疫測定試薬の調製

ポリスチレンラテックス（粒径0.4μm、積水化学工業社製）の0.02重量%リン酸緩衝液（pH5.0、50mM）分散液を25℃で保持したもの1mlに、抗ヒトHBs抗原ヤギ抗体の1mg/mlリン酸緩衝液（pH5.0、50mM）溶液の50μl、および、西洋ワサビペルオキシダーゼの1mg/ml

リン酸緩衝液 (pH 5.0, 50 mM) 溶液の 50 μ l を添加し、25℃で1時間攪拌した。

次に、15000 rpm で15分間、遠心分離を行い、上清を除き、沈殿物をリン酸緩衝液 (pH 5.0, 50 mM) 1 ml に分散させ第1試薬とした。

【0039】

次に、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体の 0.4 mg/ml 溶液の 1 ml、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンの 1 mg/ml 溶液の 1 ml、2 mM の 4-アミノアンチピリン溶液の 1 ml、および、10 mM の過酸化水素溶液の 1.2 ml をリン酸緩衝液 (pH 7.0, 50 mM) 10 ml に溶解し、第2試薬とした。

すなわち、本実施例の免疫測定試薬は、上記第1試薬と第2試薬とからなる。

【0040】

(2) 次いで、この免疫測定試薬を用いて、標準HBs抗原による検量線を作成し、次いでHBs抗原陽性血清を検体として、その中のHBs抗原力価を測定した。

(2-1) 標準HBs抗原

HBs抗原を0, 10, 25, 50, 75, 100 I. U. /ml 濃度で含むヒト血清を標準品として使用した。

(2-2) 検量線の作成

日立自動分析装置7150型を用いて測定した。上記(2-1)項の標準HBs抗原液20 μ l と上記第1試薬120 μ l とを混合し、37℃で10分保持した後、上記第2試薬120 μ l を添加し、その後、1分および10分後に吸光度を波長600 nm で測定した。この差を吸光度変化とした。標準HBs抗原力価と吸光度変化の関係の検量線を図1に示した。図1において、縦軸は600 nm における吸光度変化量を、横軸は血清中のHBs抗原力価 (I. U. /ml) を示す。

【0041】

(2-3) HBs抗原陽性血清の測定

(2-2) 検量線の作成の項における標準HBs抗原液20 μ l の代わりに、

HBs 抗原陽性血清 $20\mu\text{l}$ を用いたことの他は、(2-2) 項と同様にして吸光度変化を求めた。得られた吸光度変化量を上記検量線にあてはめて、HBs 抗原陽性血清中の HBs 抗原力価を求めた。なお、HBs 抗原陽性血清としては、6 検体 (検体名称 A, B, C, D, E, F) について測定し、それぞれの血清について繰り返し回数 5 で行い、平均値とその変動係数 (CV) (%) を求めた。結果を表 1 に示した。

【0042】

【表 1】

患者名	血清中の HBs 抗原力価 (I. U. /ml)	変動係数 (%)
A	8.5	7
B	6.3	8
C	8.9	8
D	10.5	4
E	5.4	9
F	3.2	9

【0043】

表 1 の結果より、本発明の免疫測定法を用いると、 10I. U. /ml 以下の微量な力価の血清も測定可能であることが分かる。

【0044】

実施例 2

(1) 免疫測定試薬の調製

可磁化粒子 (Fe_2O_3) 含有ポリスチレンラテックス (粒径 $0.4\mu\text{m}$ 、ベリタス社製) の 0.02 重量%リン酸緩衝液 (pH 5.0、 50mM) 分散液を 25°C で保持したもの 1ml 中に、抗ヒト HBs 抗原ヤギ抗体 0.05mg 、および、西洋ワサビペルオキシダーゼ 0.05mg を添加し、 25°C で 1 時間攪拌した。

次に、 15000rpm で 15 分間、遠心分離を行い、上清を除き、沈殿物を

リン酸緩衝液 (pH 5.0, 50 mM) 1 ml に分散させ試薬 A とした。

【0045】

可磁化粒子 (Fe_2O_3) 含有ポリスチレンラテックス (粒径 0.4 μm 、ベリタス社製) の 0.02 重量% リン酸緩衝液 (pH 5.0, 50 mM) 分散液を 25℃ で保持したもの 1 ml 中に、抗ヒト CRP ヤギ抗体 0.05 mg、および、 β -ガラクトシダーゼ 0.75 mg を添加し、25℃ で 1 時間攪拌した。

次に、15000 rpm で 15 分間、遠心分離を行い、上清を除き、沈殿物をリン酸緩衝液 (pH 5.0, 50 mM) 1 ml に分散させ試薬 B とした。

上記試薬 A 及び試薬 B を 1 : 1 の比率で混合し、第 1 試薬とした。

【0046】

次に、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体の 0.4 mg/ml 溶液の 1 ml、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンの 1 mg/ml 溶液の 1 ml、2 mM の 4-アミノアンチピリン溶液の 1 ml、および、10 mM の過酸化水素溶液の 1.2 ml をリン酸緩衝液 (pH 7.0, 50 mM) 10 ml に溶解し、試薬 C とした。

【0047】

次に、抗 β -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体の 0.4 mg/ml 溶液の 1 ml、o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド 0.1 g をリン酸緩衝液 (pH 7.0, 50 mM) 10 ml に溶解し、試薬 D とした。

上記試薬 C 及び試薬 D を 1 : 1 の比率で混合し、第 2 試薬とした。

すなわち、本実施例の免疫測定試薬は、上記第 1 試薬と第 2 試薬とからなる。

【0048】

(2) 次いで、この免疫測定試薬を用いて、標準 HBs 抗原および標準 CRP の両方を含むヒト血清検体を用いて測定し、標準 HBs 抗原および標準 CRP による検量線を作成し、次いで HBs 抗原陽性、かつ、CRP 陽性血清を検体として、その中の HBs 抗原力価および CRP 濃度を測定した。

(2-1) 標準 HBs 抗原および標準 CRP の両方を含むヒト血清検体

HBs 抗原を 0 I. U. /ml、かつ、標準 CRP を 0 mg/dl 含む血清検体；HBs 抗原を 10 I. U. /ml、かつ、標準 CRP を 1 mg/dl 含む血

清検体；HBs抗原を25 I. U. /ml、かつ、標準CRPを2.5 mg/dl含む血清検体；HBs抗原を50 I. U. /ml、かつ、標準CRPを5 mg/dl含む血清検体；HBs抗原を75 I. U. /ml、かつ、標準CRPを7.5 mg/dl含む血清検体；HBs抗原を100 I. U. /ml、かつ、標準CRPを10 mg/dl含む血清検体を標準品として使用した。

【0049】

(2-2) 検量線の作成

日立分光光度計U3200型を用いて測定した。上記(2-1)項の標準HBs抗原および標準CRPの両方を含むヒト血清検体20 μ lと上記第1試薬120 μ lとを混合し、37℃で10分保持した後、上記第2試薬120 μ lを添加し、その10分後に、磁石を用いて不溶性担体を反応容器底部に引きつけ、上清の溶液の吸光度を600 nmと420 nmで測定した。

得られた測定値について、吸光度600 nmのものについては、標準HBs抗原を含有するそれぞれの血清で得られた値から、標準HBs抗原濃度0 I. U. /mlの血清で得られた値を差し引いて、吸光度変化値とした。

得られた測定値について、吸光度420 nmのものについては、標準CRPを含有するそれぞれの血清で得られた値から、標準CRP濃度0 mg/dlの血清で得られた値を差し引いて、吸光度変化値とした。

【0050】

標準HBs抗原力価と吸光度変化の関係、および、標準CRPと吸光度変化の関係の検量線を図2に示した。図2において、縦軸は600 nmまたは420 nmにおける吸光度変化量を、横軸は血清中のHBs抗原力価(I. U. /ml)またはCRP濃度(mg/dl)を示す。

【0051】

(2-3) HBs抗原陽性、かつ、CRP陽性血清の測定

(2-2) 検量線の作成の項における標準HBs抗原および標準CRPの両方を含むヒト血清検体20 μ lの代わりに、HBs抗原陽性、かつ、CRP陽性血清20 μ lを用いたことの他は、(2-2)項と同様にして吸光度変化を求めた。得られた吸光度変化量を上記検量線にあてはめて、HBs抗原陽性、かつ、C

R P 陽性血清中の H B s 抗原力価および C R P 濃度を求めた。なお、H B s 抗原陽性、かつ、C R P 陽性血清としては、6 検体（検体名称 A, B, C, D, E, F）について測定し、それぞれの血清について繰り返し回数 5 で行い、平均値とその変動係数（C V）（％）求めた。結果を表 2 および表 3 に示した。

【0052】

【表 2】

患者名	血清中の H B s 抗原力価 (I. U. /ml)	変動係数 (%)
A	8. 5	7
B	6. 3	8
C	8. 9	8
D	10. 5	4
E	5. 4	9
F	3. 2	9

【0053】

【表 3】

患者名	C R P 濃度 (mg/dl)	変動係数 (%)
A	0. 8	10
B	2	8
C	1	4
D	0. 5	14
E	0. 4	14
F	0. 2	18

【0054】

表 2 及び表 3 の結果より、本発明の免疫測定法を用いると、H B s 抗原力価が 10 I. U. /ml 以下の微量な力価の血清も、微量な C R P 抗原濃度と同時に

測定可能であることが分かる。

【0055】

【発明の効果】

請求項1記載の免疫測定法は、上述の通りであり、本発明によると、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、B/F分離を必要としないので、簡便に測定できる。

請求項4記載の免疫測定法は、上述の通りであり、B/F分離が簡便化されているので測定が簡便化されると共に、本発明によると、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く、一度に多項目同時測定できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例1によって得られた検量線であり、縦軸は600nmにおける吸光度変化量を、横軸は血清中のHBs抗原力価（I. U. /ml）を示す。

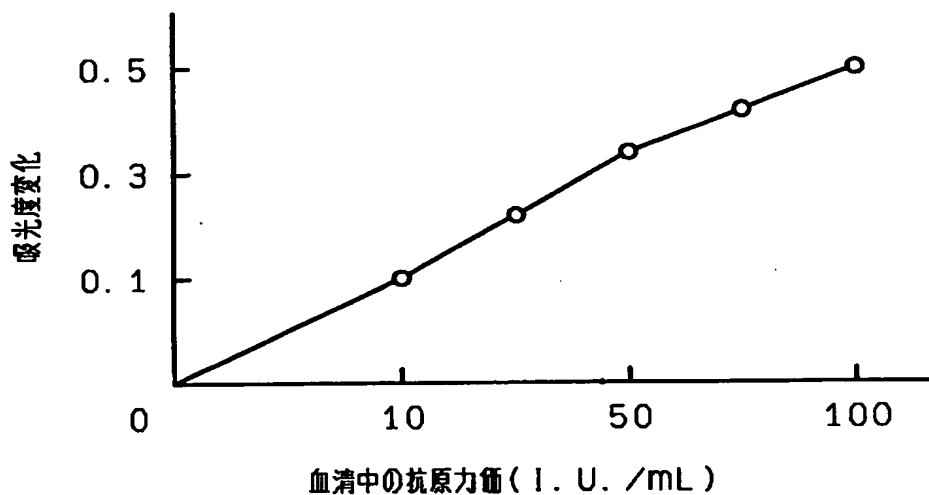
【図2】

実施例2によって得られた検量線であり、縦軸は600nmまたは420nmにおける吸光度変化量を、横軸は血清中のHBs抗原力価（I. U. /ml）またはCRP濃度（mg/dl）を示す。

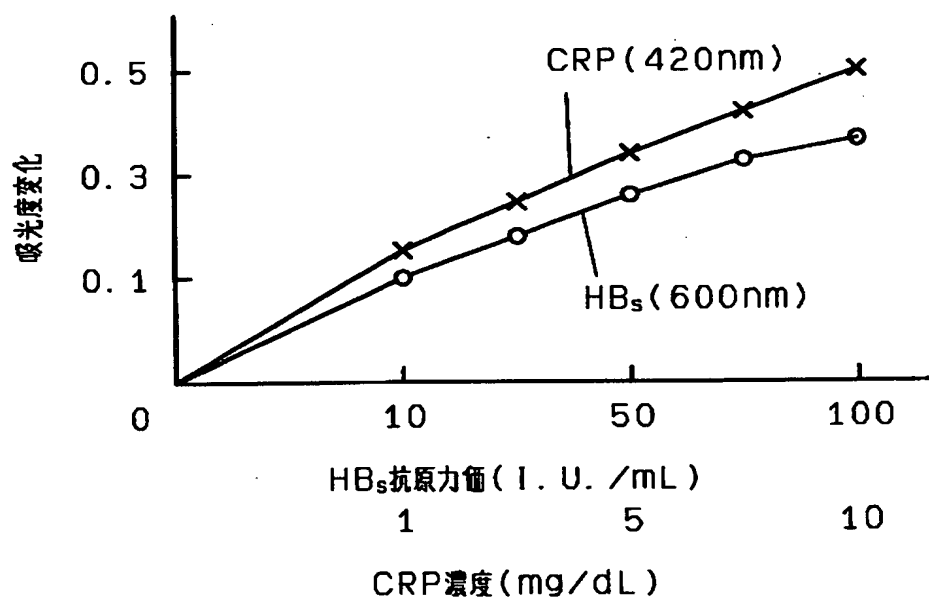
【書類名】

図面

【図1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ①試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、B/F分離を必要としないか、またはB/F分離を簡便化して、簡便に分析測定できる免疫測定法、②B/F分離を簡便化して、測定を簡便化し、一度に多項目測定可能な免疫測定法、のうちの少なくとも一つを提供する。

【解決手段】 試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定法であって、（a）上記抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素とを担持させた不溶性担体、（b）上記酵素の活性を阻害する酵素阻害剤（例、上記酵素に対する抗体）、および（c）上記酵素の基質と上記試料とを混合し、抗原抗体反応による不溶性担体の凝集反応と酵素反応を生じせしめ、生じた反応の度合いを測定することを特徴とする免疫測定法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002174]

1. 変更年月日	1990年 8月29日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
氏 名	積水化学工業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)